

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

corr. US 6,030,845 and EP 0 822 412

DIALOG(R) File 352:Derwent WPI  
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011686117

WPI Acc No: 1998-103027/199810

Agglutination assay for antibodies or antigens in whole blood - comprises assaying directly on lysed sample, useful in blood analysis without pre-treatment

Patent Assignee: HORIBA LTD (HORB )

Inventor: OKU N; YAMAO Y

Number of Countries: 020 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 822412	A1	19980204	EP 97111860	A	19970711	199810 B
JP 10048214	A	19980220	JP 96217966	A	19960730	199818
US 6030845	A	20000229	US 97914039	A	19970728	200018
JP 2001296292	A	20011026	JP 96217966	A	19960730	200203
			JP 200187253	A	19960730	
JP 3249919	B2	20020128	JP 96217966	A	19960730	200214

Priority Applications (No Type Date): JP 96217966 A 19960730; JP 200187253 A 19960730

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 822412 A1 E 15 G01N-033/546

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

JP 10048214 A 6 G01N-033/543

US 6030845 A G01N-033/546

JP 2001296292 A 8 G01N-033/483 Div ex application JP 96217966

JP 3249919 B2 6 G01N-033/543 Previous Publ. patent JP 10048214

Abstract (Basic): EP 822412 A

The following are claimed: (1) an immunoassay in which antibodies (Ab's) or antigens (Ag's) in a sample are subjected to agglutination reaction with insoluble carriers onto which Ag's/Ab's specifically reacting with the Ag's/Ab's in the sample (especially forcibly lysed whole blood) have been immobilised comprises determining the resulting agglutination mixture for the change in its absorbance or in its scattered light by irradiation with light; (2) an immunoassay similar to (1), but which further comprises calculating the haematocrit % using a formula (1):  $A' = A \times 100 / (100 - \text{haematocrit} \%)$  A = the absorbance or its change or the strength of light scattering or its change determined, and A' = the corrected absorbance or its change or the strength of light scattering or its change assuming that the plasma component in the sample is 100.

USE - The immunoassay is used for analysis of blood without pretreatment by, e.g. centrifuging.

ADVANTAGE - The assay is effected easily in a short time.

Dwg. 0/9

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/483; G01N-033/543; G01N-033/546

International Patent Class (Additional): G01N-021/03; G01N-033/53;

G01N-033/531

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-048214

(43)Date of publication of application : 20.02.1998

(51)Int.CI.

G01N 33/543  
G01N 33/543  
G01N 33/531

(21)Application number : 08-217966

(71)Applicant : HORIBA LTD

(22)Date of filing : 30.07.1996

(72)Inventor : YAMAO YASUO  
OKU NARIHIRO

## (54) IMMUNOASSAY

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To measure a blood conveniently in a short time without requiring any pretreatment through a centrifugal separator by subjecting a whole blood intendedly and forcibly to hemolysis using a method having no effect on agglutination.

**SOLUTION:** Insoluble particles fixed with an antibody or an antigen reacting specifically on an antigen or an antibody in a sample is subjected to agglutination with the antigen or the antibody in the sample to produce an aggregated mixed liquid which is then irradiated with light in order to measure variation in the absorbance or scattering light. In this regard, a whole blood is employed as the sample and subjected forcibly to hemolysis. In this regard, the whole blood is subjected forcibly to hemolysis by mixing the whole blood with a hypoosmotic liquid or a hemolytic saponins solution, by freezing and melting the whole blood or by subjecting the whole blood to ultrasonic vibration.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.03.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3249919

[Date of registration] 09.11.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-48214

(43) 公開日 平成10年(1998)2月20日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 33/543  
33/531

識別記号  
5 8 1  
5 8 7

府内整理番号

F I  
G 0 1 N 33/543  
33/531

5 8 1 H  
5 8 7

技術表示箇所  
B

審査請求 未請求 請求項の数7 FD (全6頁)

(21) 出願番号

特願平8-217966

(22) 出願日

平成8年(1996)7月30日

(71) 出願人 000155023

株式会社堀場製作所

京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地

(72) 発明者 山尾 泰生

京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地

株式会社堀場製作所内

(72) 発明者 奥 成博

京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地

株式会社堀場製作所内

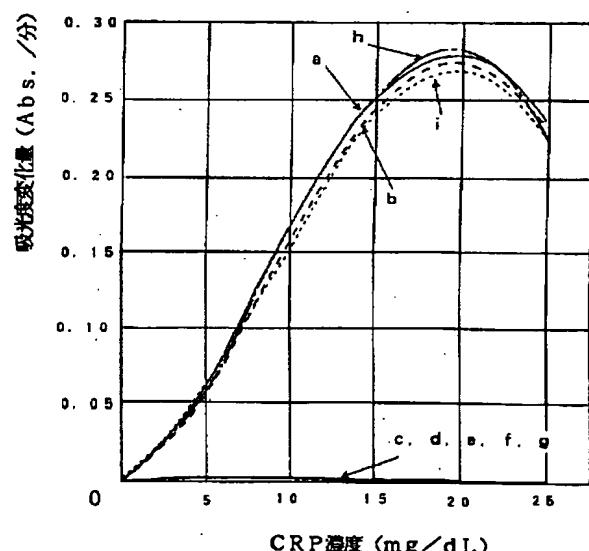
(74) 代理人 弁理士 藤本 英夫

(54) 【発明の名称】 免疫測定方法

(57) 【要約】

【課題】 遠心分離機などによって血液を前処理しなくても簡便にしかも短時間で測定を行うことができる免疫測定方法を提供すること。

【解決手段】 被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する免疫測定方法において、前記被検体試料として全血Bを用い、この全血を強制的に溶血させるようにしている。



(2)

1

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する免疫測定方法において、前記被検体試料として全血を用い、この全血を強制的に溶血させるようにしたことを特徴とする免疫測定方法。

**【請求項2】** 全血を低張液と混合することにより全血を強制的に溶血させるようにした請求項1に記載の免疫測定方法。

**【請求項3】** 全血を溶血性サポニン類溶液と混合することにより全血を強制的に溶血させるようにした請求項1に記載の免疫測定方法。

**【請求項4】** 全血を凍結融解することにより全血を強制的に溶血させるようにした請求項1に記載の免疫測定方法。

**【請求項5】** 全血に超音波振動を与えることにより全血を強制的に溶血させるようにした請求項1に記載の免疫測定方法。

**【請求項6】** 抗原または抗体と特異的に反応する抗体または抗原を固定化した不溶性粒子懸濁試薬に溶血性サポニン類を含有させた請求項1に記載の免疫測定方法。

**【請求項7】** 全血を被検体試料とし、全血中の抗原または抗体と特異的に反応する抗原または抗体を固定化した不溶性粒子懸濁試薬と前記被検体試料中の抗体または抗原とを凝集反応させる工程と、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する工程と、被検体試料のヘマトクリット%を用いて、  
 $A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット} \%)$

(但し、A：測定された吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量、A'：被検体試料中の血漿成分を100%に換算した吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量)なる演算を行う工程とを含むことを特徴とする免疫測定方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

**【発明の属する技術分野】** この発明は、免疫測定方法に関するもので、より詳しくは、被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対して近赤外光または赤外光を照射し、そのときの吸光度変化または散乱光変化を測定するようにした免疫測定方法に関するものである。

**【0002】**

**【従来の技術およびその欠点】** 前記免疫測定方法として、特公昭58-11575号公報に開示されるものがある。すなわち、この公報の方法は、抗原あるいは抗体を固定化した不溶性粗体と体液試料中の抗体あるいは抗

原とを抗原抗体反応させ、その反応混合液に600～2400nmから選ばれた波長の光を照射し、その吸光度の増加を測定するものである。この方法は、その有用性から所謂ラテックス免疫比濁法として、現在では免疫測定の主流となっている。

**【0003】** ところが、上記測定方法において用いられる測定試料は、水、血清、尿、食塩水などである。また、臨床検査における一般的な採血の注意点としては、溶血を極力避け、できるだけ速やかに血清・血漿分離することである。この理由は、溶血による光学的測定への影響、血球膜を通してのNa、K、Clなどの物質の出入り、血球代謝による移動（解糖による乳酸、ビルビン酸の血清中への移動）の影響、目的成分の血球中と血清中の濃度差による影響などが挙げられる。

**【0004】** 以上のことから、被検者から得られた血液は、遠心分離を行って血清または血漿に分離した試料を使用しなければならなかった。このため、血液を大量に処理できる大または中病院の中央検査室などでは支障はないが、開業医や緊急検査室では、遠心分離機による前処理が行えないことがあり、したがって、上記方法は必ずしも万全のものではない。

**【0005】** そして、このような一般的な全血の取り扱い環境にあって、免疫検査領域において、血清・血漿分離を行うことなく、全血を直接に測定試料とする精密定量測定方法は存在しなかった。また、血液を溶血せずに測定することは、光学的手段を用いて測定する場合において、赤血球による濁りが大きく、不向きであった。

**【0006】** この発明は、上述の事柄に留意してなされたもので、その第1の目的は、遠心分離機などによって血液を前処理しなくとも簡便にしかも短時間で測定を行うことができる免疫測定方法を提供することであり、第2の目的は、免疫反応に影響しない方法によって血球を故意かつ強制的に溶血させた試料を用いることによって、各種の定量試薬と組み合わせて、精度のよいデータを得ることができる直接に全血を試料とした免疫測定方法を提供することである。

**【0007】**

**【課題を解決するための手段】** この出願の発明者らは、鋭意研究した結果、前記臨床検査における一般的な採血の注意点としての溶血を極力避け、できるだけ速やかに血清・血漿分離するという固定概念を覆し、意外にも、凝集反応に影響しない方法を用いて故意かつ強制的に全血を溶血させることにより、全血中の抗原あるいは抗体を測定できることを見出した。

**【0008】** すなわち、第1の目的を達成するため、第1の発明では、被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する免疫測定方法において、前記被

(3)

3

検体試料として全血を用い、この全血を強制的に溶血させるようにしている。

【0009】この場合、全血を強制的に溶血させる手段としては、

- ① 全血を低張液と混合する、
- ② 血を溶血性サポニン類溶液と混合する、
- ③ 全血を凍結融解する、
- ④ 全血に超音波振動を与える、

などを採用することができる。

【0010】そして、抗原または抗体と特異的に反応する抗体または抗原を固定化した不溶性粒子懸濁試薬に溶血性サポニン類を含有させてもよい。

【0011】また、第2の目的を達成するため、第2の発明の免疫測定方法は、全血を被検体試料とし、全血中の抗原または抗体と特異的に反応する抗原または抗体を固定化した不溶性粒子懸濁試薬と前記被検体試料中の抗体または抗原とを凝集反応させる工程と、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する工程と、被検体試料のヘマトクリット%を用いて、

$$A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット\%})$$

(但し、A：測定された吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量、A'：被検体試料中の血漿成分を100%に換算した吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量)なる演算を行う工程とを含んだことを特徴としている。

【0012】第1の発明によれば、

- ① 全血被検液を遠心分離操作などの前処理を行うこと \*

(4)

\*なく、直接、全血被検液を用いることにより、測定時間の短縮、測定コストの低減および測定操作の簡略化が図れる。そして、遠心分離操作を行う必要がないということは、遠心分離機や遠心分離容器の費用、被検液の採血容器から遠心分離容器への移替えの手間および遠心分離操作のための時間が不要になるとともに、それだけ、検査要員が血液に接触する機械が少なくて済み、感染への危険性が大幅に低減される。

【0013】② 抗原抗体反応に影響しない方法で全血中の血球を強制的に溶血させることにより、一般的なラテックス免疫比濁法を用いた測定キットと組み合わせることができ、精度のよい測定データを得ることができるとともに、広範囲な応用が可能になる。

【0014】③ 溶血試薬をラテックス試薬に含ませることによって、測定装置の構成を簡単にすることができ、測定時間を短縮することができる。

【0015】そして、第2の発明によれば、ヘマトクリット補正を行うことにより、精度の優れたデータを得ることができる。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、この発明の詳細を実施例によって詳細に説明する。

【0017】まず、各実施例を説明する前に、検討に用いた試薬を下記表1に示す。なお、この表1における符号a～gは、以下の図5～7における符号と同じである。

【0018】

【表1】

	溶 血 方 法	W/V%濃度	吸光度(800nm)	△吸光度/min
溶 血 試 薬 水 溶 液	a 純水(イオン交換水)		0.204	0.003
	b サポニン水溶液	0.5	0.147	0.000
	c トリトンX-100 (非イオン界面活性剤)	0.5	0.146	0.000
	d Tween-20 (非イオン界面活性剤)	0.5	0.298	0.055
	e Br I J-35 (非イオン界面活性剤)	0.5	2.312	
	f ラウリル硫酸ナトリウム (アニオン界面活性剤)	0.5	0.176	0.000
	g ベンザルコニウムクロライド (カチオン界面活性剤)	0.5	0.139	0.000
凍 結 溶 液	h 凍結溶血		0.163	0.000
	i 超音波ノズル溶血		0.196	0.001
	j 生理食塩水		3.000	

【0019】【実施例1】：溶血試薬による溶血法

50 EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採

(4)

5

血した人全血 0.04 mL を、図 1 に示すようなセル長 5 mm の石英製のセル 5 に収容し、これに、前記表 1 に示した溶血試薬水溶液 a ~ g をそれぞれ 2.0 mL 添加し、図 2 に示すような分光光度計 1 (例えば日立製作所製: U-3410) を用いて、波長 300 ~ 1000 nm における吸収スペクトル (図 5 参照)、波長 800 nm における溶血反応タイムコース (図 6 参照) および波長 800 nm におけるそれぞれの反応開始後 5 分目の吸光度と反応開始後 4 ~ 5 分目における 1 分間当たりの吸光度変化 (表 1 参照) を求め、各種溶血試薬の溶血能力を調べた。

【0020】なお、前記図 2において、2 は近赤外光または赤外光などの照射光 L を発するハロゲンランプからなる光源、3 は集光レンズ、4 は回折格子、6 は増幅器、7 はコンピュータなどの演算・記録装置である。また、8 はセル 5 内に収容された試料としての溶血処理を施した全血である。

【0021】図 5 に示すように、試薬 j (生理食塩水) の未溶血ではその濁りによって全波長での吸光度が 2.5 以上となり、ラテックス凝集反応を光学的に検出する際に影響を与える結果となった。一方、同図に示すように、試薬 a (純水)、試薬 b (サポニン水溶液) を用いることにより、上記のような濁りはなくなり、ラテックス凝集度合いを検出できることが判った。また、表 1 および図 6 から、試薬 a (純水)、試薬 b (サポニン)、試薬 c (トリトン X-100)、試薬 f (ラウリル硫酸ナトリウム) および試薬 g (ベンザルコニウムクロライド) は、人全血を短期間に溶血する能力があることが判る。

【0022】[実施例 2] : 凍結による溶血法

図 3 は、全血を溶血させるのに用いる凍結セルホルダー 9 の一例を示すもので、セル 5 を挿入保持できるとともに、測光窓 10 を備えたアルミニウム製のセルブロック 11 にペルチェ素子 (例えばメルコア製) 12 を接合してなるものである。13 はペルチェ素子 12 に適宜の直流電流を供給するための電源、14 は光源 2 からの近赤外光または赤外光である。

【0023】EDTA-2 K 抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血 0.04 mL を、図 3 に示すように、凍結セルホルダー 9 にセットされたセル 5 内に収容し、ペルチェ素子 12 に所定の方向の電流を 10 分間通電して人全血を完全に凍結した。その後、ペルチェ素子 12 に方向とは逆方向の電流を通電して凍結した人全血を融解し、これに生理食塩水 2.0 mL を添加して融解希釈した後、分光光度計 1 を用いて波長 800 nm における反応開始後 5 分目の吸光度と反応開始後 4 ~ 5 分目における 1 分間当たりの吸光度変化 (表 1 参照) を求め、溶血試薬の溶血能力を調べた。表 1 において h で示すように、人全血を凍結・融解することによってこれ 4 溶血できることが判る。

6

【0024】[実施例 3] : 超音波振動による溶血法  
図 4 は、全血を溶血させるのに用いる超音波ノズル 14 の一例を示すもので、ステンレス鋼製のノズル 15 に超音波発振子 16 を結合したもので、17 は発振回路、18 は吸引用シリンジである。

【0025】EDTA-2 K 抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血 0.04 mL をノズル 15 内に吸引し、その状態で超音波発振子 16 を 5 分間動作させることにより、ノズル 15 内の人全血 B を溶血した。

10 その後、この溶血した人全血 B を全量セル 5 に収容し、さらに、これに生理食塩水 2.0 mL を添加して希釈した後、分光光度計 1 を用いて波長 800 nm における反応開始後 5 分目の吸光度と反応開始後 4 ~ 5 分目における 1 分間当たりの吸光度変化 (表 1 参照) を求め、溶血試薬の溶血能力を調べた。表 1 において符号 i で示すように、人全血に超音波振動を与えることによりこれを溶血できることが判る。

【0026】[実施例 4] : CRP の測定方法 1

1) 抗 CRP 抗体感作ラテックス液の調整

20 平均粒径 0.2 μm のポリスチレンラテックス (例えば日本合成ゴム社製: 固形分 10%) 10 mL に、約 10 mg/mL の抗ヒト CRP ウサギ抗体液 (pH 7.5, 100 mmol/L トリス塩酸緩衝液、0.1% アジ化 Na) を添加し、30°C で一夜静置した後、3600 rpm で遠心分離した沈殿物に 0.2 W/V% 牛血清アルブミン pH 8.5, 100 mmol/L トリス塩酸緩衝液を添加し、抗ヒト CRP 抗体感作ラテックス懸濁液に調整した。

【0027】2) CRP 測定方法

30 EDTA-2 K 抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血 0.04 mL をセル 1 に収容し、これに、表 1 に示した溶血試薬水溶液 a ~ g を 0.5 mL 添加し、37°C で 3 分間インキュベーションした後、上記 1) で調整した抗ヒト CRP 抗体感作ラテックス懸濁液を 1.5 mL 添加し、分光光度計 1 を用いて波長 800 nm における反応開始後 4 ~ 5 分目における 1 分間当たりの吸光度変化を求めた。

40 【0028】別途、血漿を検体とした市販のラテックス免疫比濁法 CRP 測定キットを用いて前記検体を検定して検量線を作成した。図 3 は、前記 CRP 測定に得られた結果に基づいて作成した検量線を示すもので、純水 a およびサポニン水溶液 bなどを用いて全血を強制的に溶血したものにおいては、図中の符号 a, b で示すように、良好な感度の検量線が得られた。しかしながら、各種界面活性剤 c ~ g を用いた場合には、凝集反応が阻害され、図中の符号 c ~ g で示すように、免疫反応には適さないという結果となった。

【0029】[実施例 5] : 凍結法または超音波振動法による溶血試料を用いた CRP 測定方法

50 前記実施例 2 または実施例 3 で溶血した後の生理食塩水

(5)

7

による希釈操作の代わりに、実施例4で作製した抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液を2.0mL添加し、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後4～5分目における1分間当たりの吸光度変化を求めた。

【0030】別途、血清または血漿を検体とした市販のラテックス免疫比濁法CRP測定キットを用いて前記検体を検定して検量線を作成した。この場合、図3の符号h, iで示すように、良好な感度の検量線が得られた。

【0031】【実施例6】：CRPの測定方法2

前記実施例4で用いた抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液の代わりに、市販のラテックス免疫比濁法CRP測定キットを用い、溶血試薬として0.5W/V%サポ\*

$$A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット}\%) \quad \cdots (1)$$

但し、A：実際に測定された吸光度変化量、A'：被検体試料中の血漿成分を100%に換算した吸光度変化量)なる演算を行って求めた分析値と血清を検体とした分析値との相関試験(n=40)を実施したところ、図9に示すように、実施例6の結果よりもより良好な結果が得られた。

【0033】上述の実施例では、凝集混合液に対する光照射による吸光度変化を測定するようにしているが、これに代えて、散乱光変化を測定するようにしてもよい。

【0034】

【発明の効果】この発明は、以上のような形態で実施され、以下のような効果を奏する。

【0035】第1の発明によれば、全血被検液を遠心分離操作などの前処理を行うことなく、直接、全血被検液を用いることができる所以、測定時間の短縮、測定コストの低減および測定操作の簡略化が図れる。そして、検査要員が血液に接触する機械が少なくて済み、感染への危険性が大幅に低減される。

【0036】そして、第2の発明によれば、ヘマトクリット補正を行うことにより、精度の優れたデータを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

8

\*ニン水溶液を用いる以外は実施例4と同様の測定方法により、波長800nmにおける反応開始後4～5分目における1分間当たりの吸光度変化を求め、事前に作成した検量線より、全血を検体としたこの発明の分析値と血清を検体とした分析値との相関試験(n=40)を実施したところ、図8に示すように、良好な結果が得られた。

【0032】【実施例7】：ヘマトクリット補正

前記実施例6において、この発明による分析値に関して、測定した全血検体を同時に血球カウンタ(例えば堀場製作所製：LC-240A)によって、そのヘマトクリット値を測定し、

10

20

30

A' = A × 100 / (100 - ヘマトクリット%)

… (1)

【図1】この発明方法で用いるセルの一例を示す斜視図である。

【図2】この発明方法で用いる分光光度計の構成を概略的に示す図である。

【図3】この発明方法で用いる凍結セルホルダーの一例を示す斜視図である。

【図4】この発明方法で用いる超音波ノズルの一例を示す斜視図である。

【図5】各種の溶血試薬水溶液を用いて全血を溶血させた試料の波長300～1000nmにおける吸収スペクトルを示す図である。

【図6】各種の溶血試薬水溶液を用いて全血を溶血させた試料の波長800nmにおける溶血反応タイムコースを示す図である。

【図7】CRP測定を行ったときに得られた検量線の一例を示す図である。

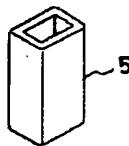
【図8】ヘマトクリット補正を行わないときにおける全血検体と血漿検体との相関関係を示す図である。

【図9】ヘマトクリット補正を行ったときにおける全血検体と血漿検体との相関関係を示す図である。

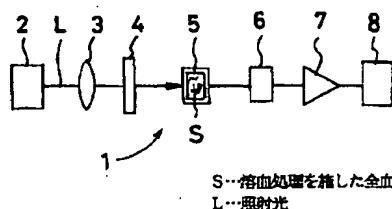
【符号の説明】

B…全血、S…溶血処理を施した全血、L…照射光。

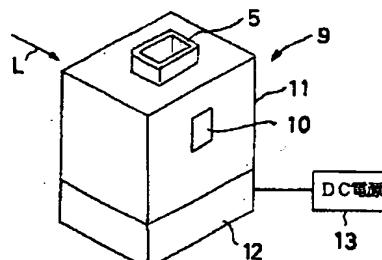
【図1】



【図2】

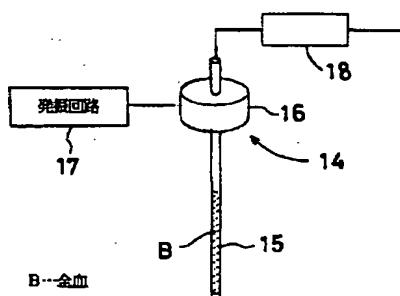


【図3】

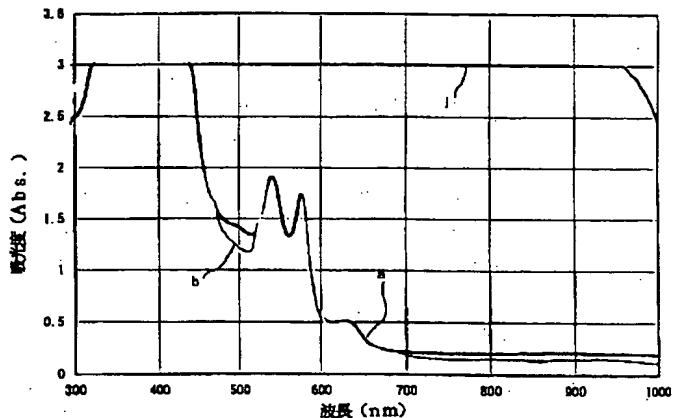


(6)

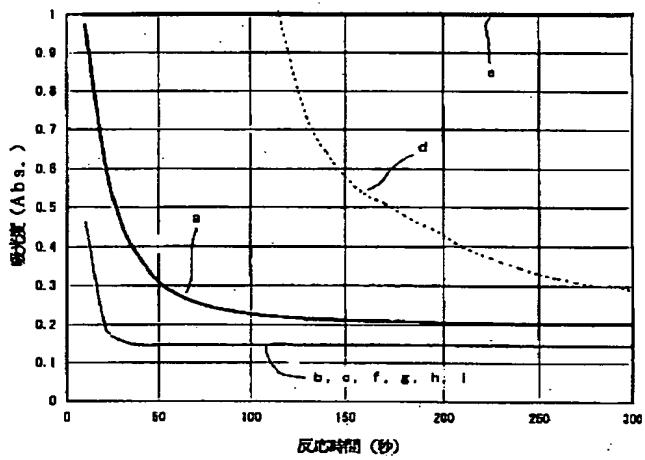
【図4】



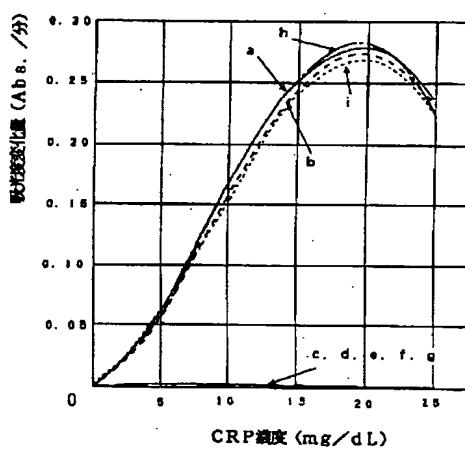
【図5】



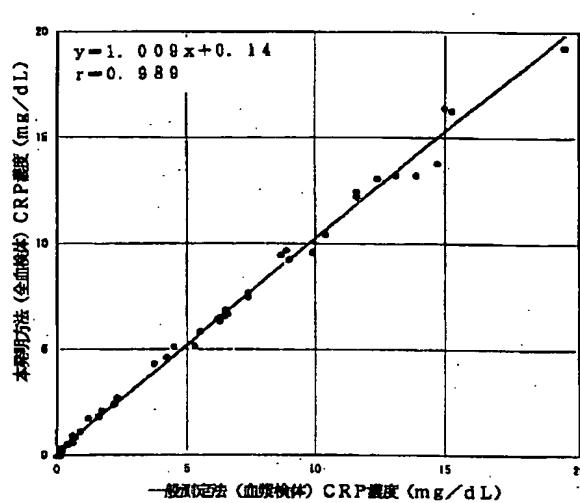
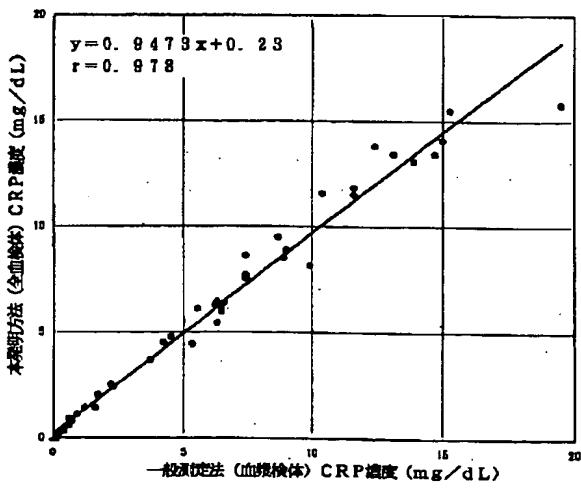
【図6】



【図7】



【図8】



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成13年11月30日(2001.11.30)

【公開番号】特開平10-48214

【公開日】平成10年2月20日(1998.2.20)

【年通号数】公開特許公報10-483

【出願番号】特願平8-217966

【国際特許分類第7版】

G01N 33/543 581

587

33/531

【F I】

G01N 33/543 581 H

587

33/531 B

#### 【手続補正書】

【提出日】平成13年3月26日(2001.3.26)

#### 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

#### 【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】免疫測定方法

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】全血を溶血性サボニン類溶液と混合することにより強制的に溶血させて被検体試料とする工程と、全血中の抗体または抗原と特異的に反応する抗原または抗体を固定化した不溶性粒子懸濁試薬と前記被検体試料中の抗体または抗原とを凝集反応させる工程と、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する工程と、被検体試料のヘマトクリット%を用いて、

$$A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット} \%)$$

(但し、A : 測定された吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量、A' : 被検体試料中の血漿成分を100%に換算した吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量)なる演算を行う工程とを含むことを特徴とする免疫測定方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、免疫測定方法に関するものである。被検体試料中の抗原あるいは抗体と特異的に反応する抗体あるいは抗原を固定化した不溶性粒子と被検体試料中の抗原あるいは抗体とを凝集反応させ、生じた凝集混合液に対して近赤外光または赤外光

を照射し、そのときの吸光度変化または散乱光変化を測定するようにした免疫測定方法に関する。

#### 【0002】

【従来の技術およびその欠点】前記免疫測定方法として、特公昭58-11575号公報に開示されるものがある。すなわち、この公報の方法は、抗原あるいは抗体を固定化した不溶性担体と液体試料中の抗体あるいは抗原とを抗原抗体反応させ、その反応混合液に600～2400nmから選ばれた波長の光を照射し、その吸光度の増加を測定するものである。この方法は、その有用性から所謂ラテックス免疫比濁法として、現在では免疫測定の主流となっている。

【0003】ところが、上記測定方法において用いられる測定試料は、水、血清、尿、食塩水などである。また、臨床検査における一般的な採血の注意点としては、溶血を極力避け、できるだけ速やかに血清・血漿分離することである。この理由は、溶血による光学的測定への影響、血球膜を通してのNa、K、Clなどの物質の出入り、血球代謝による移動（解糖による乳酸、ビルビン酸の血清中への移動）の影響、目的成分の血球中と血清中の濃度差による影響などが挙げられる。

【0004】以上のことから、被検者から得られた血液は、遠心分離を行って血清または血漿に分離した試料を使用しなければならなかった。このため、血液を大量に処理できる大または中病院の中央検査室などでは支障はないが、開業医や緊急検査室では、遠心分離機による前処理が行えないことがあり、したがって、上記方法は必ずしも万全のものではない。

【0005】そして、このような一般的な全血の取り扱い環境にあって、免疫検査領域において、血清・血漿分離を行うことなく、全血を直接に測定試料とする精密定量測定方法は存在しなかった。また、血液を溶血せずに

(2)

3

測定することは、光学的手段を用いて測定する場合において、赤血球による濁りが大きく、不向きであった。

【0006】この発明は、上述の事柄に留意してなされたもので、その目的は、遠心分離機などによって血液を前処理しなくとも簡便にしかも短時間で測定を行うことができるとともに、免疫反応に影響しない方法によって血球を故意かつ強制的に溶血させた試料を用いることによって、各種の定量試薬と組み合わせて、精度のよいデータを得ることができることを直接に全血を試料とした免疫測定方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】この出願の発明者らは、鋭意研究した結果、前記臨床検査における一般的な採血の注意点としての溶血を極力避け、できるだけ速やかに血清・血漿分離するという固定概念を覆し、意外にも、凝集反応に影響しない方法を用いて故意かつ強制的に全血を溶血させることにより、全血中の抗原あるいは抗体を測定できることを見出した。

【0008】

【0009】

【0010】

【0011】前記目的を達成するため、この発明の免疫測定方法は、全血を溶血性サポニン類溶液と混合することにより強制的に溶血させて被検体試料とする工程と、全血中の抗体または抗原と特異的に反応する抗原または抗体を固定化した不溶性粒子懸濁試薬と前記被検体試料中の抗体または抗原とを凝集反応させる工程と、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化または散乱光変化を測定する工程と、被検体試料のヘマトクリット%を用いて、

$$A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット}\%)$$

(但し、A：測定された吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量、A'：被検体試

4

料中の血漿成分を100%に換算した吸光度あるいは吸光度変化量または光散乱強度あるいは光散乱変化量)なる演算を行う工程とを含んだことを特徴としている。

【0012】この発明によれば、

① 全血被検液を遠心分離操作などの前処理を行なうことなく、直接、全血被検液を用いることにより、測定時間の短縮、測定コストの低減および測定操作の簡略化が図れる。そして、遠心分離操作を行う必要がないということは、遠心分離機や遠心分離容器の費用、被検液の採血管から遠心分離容器への移替えの手間および遠心分離操作のための時間が不要になるとともに、それだけ、検査要員が血液に接触する機会が少なくて済み、感染への危険性が大幅に低減される。

【0013】② 抗原抗体反応に影響しない方法で全血中の血球を強制的に溶血させることにより、一般のラテックス免疫比濁法を用いた測定キットと組み合わせることができ、精度のよい測定データを得ることができるとともに、広範囲な応用が可能になる。

【0014】③ 溶血試薬をラテックス試薬に含ませることによって、測定装置の構成を簡単にすることができます、測定時間を短縮することができる。

【0015】④ ヘマトクリット補正を行うことにより、精度の優れたデータを得ることができる。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、この発明の詳細を実施例によって詳細に説明する。

【0017】まず、各実施例を説明する前に、検討に用いた試薬を下記表1に示す。なお、この表1における符号a～gは、以下の図5～7における符号と対応している。

【0018】

【表1】

(3)

5

6

	溶血方法	W/V%濃度	吸光度(800 nm)	△吸光度/min
試 薬 水 溶 液	a 純水(イオン交換水)		0.204	0.003
	b サポニン水溶液	0.5	0.147	0.000
	c トリトンX-100 (非イオン界面活性剤)	0.5	0.146	0.000
	d Tween-20 (非イオン界面活性剤)	0.5	0.298	0.055
	e BrJ-35 (非イオン界面活性剤)	0.5	2.312	
	f ラウリル硫酸ナトリウム (アニオン界面活性剤)	0.5	0.176	0.000
	g ベンザルコニウムクロライド (カチオン界面活性剤)	0.5	0.139	0.000
	h 凍結溶血		0.163	0.000
30	i 超音波ノズル溶血		0.198	0.001
	j 生理食塩水		0.000	

## 【0019】〔実施例1〕：溶血試薬による溶血法

EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血0.04mLを、図1に示すようなセル長5mmの石英製のセル5に収容し、これに、前記表1に示した溶血試薬水溶液a～gをそれぞれ2.0mL添加し、図2に示すような分光光度計1（例えば日立製作所製：U-3410）を用いて、波長300～1000nmにおける吸光スペクトル（図5参照）、波長800nmにおける溶血反応タイムコース（図6参照）および波長800nmにおけるそれぞれの反応開始後5分目の吸光度と反応開始後4～5分目における1分間当たりの吸光度変化（表1参照）を求め、各種溶血試薬の溶血能力を調べた。

【0020】なお、前記図2において、2は近赤外光または赤外光などの照射光Lを発するハロゲンランプからなる光源、3は集光レンズ、4は回折格子、5はセル、6は受光器、7は増幅器、8はコンピュータなどの演算・記録装置である。また、Sはセル5内に収容された試料としての溶血処理を施した全血である。

【0021】図5に示すように、試薬j（生理食塩水）の未溶血ではその濁りによって全波長での吸光度が2.5以上となり、ラテックス凝集反応を光学的に検出する際に影響を与える結果となった。一方、同図に示すように、試薬a（純水）、試薬b（サポニン水溶液）を用いることにより、上記のような濁りはなくなり、ラテックス凝集度合いを検出できることが判った。また、表1および図6から、試薬a（純水）、試薬b（サポニン）、試薬c（トリトンX-100）、試薬f（ラウリル硫酸ナトリウム）および試薬g（ベンザルコニウムクロライド）は、人全血を短期間に溶血する能力があることが判

る。

## 【0022】〔実施例2〕：凍結による溶血法

図3は、全血を溶血させるのに用いる凍結セルホルダー9の一例を示すもので、セル5を挿入保持できるとともに、測光窓10を備えたアルミニウム製のセルブロック11にペルチェ素子（例えばメルコア製）12を接合してなるものである。13はペルチェ素子12に適宜の直流電流を供給するための電源、Lは光源2からの近赤外光または赤外光である。

【0023】EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血0.04mLを、図3に示すように、凍結セルホルダー9にセットされたセル5内に収容し、ペルチェ素子12に所定の方向の電流を10分間通電して人全血を完全に凍結した。その後、ペルチェ素子12に前記方向とは逆方向の電流を通電して凍結した人全血を融解し、これに生理食塩水2.0mLを添加して融解希釈した後、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後5分目の吸光度と反応開始後4～5分目における1分間当たりの吸光度変化（表1参照）を求め、溶血試薬の溶血能力を調べた。表1においてhで示すように、人全血を凍結・融解することによってこれを溶血できることが判る。

## 【0024】〔実施例3〕：超音波振動による溶血法

図4は、全血を溶血させるのに用いる超音波ノズル14の一例を示すもので、ステンレス鋼製のノズル15に超音波発振子16を結合したもので、17は発振回路、18は吸引用シリジである。

【0025】EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血0.04mLをノズル15内に吸引し、その状態で超音波発振子16を5分間動作さ

(4)

7

せることにより、ノズル15内の人全血Bを溶血した。その後、この溶血した人全血Bを全量セル5に収容し、さらに、これに生理食塩水2.0mLを添加して希釈した後、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後5分目の吸光度と反応開始後4～5分目における1分間当たりの吸光度変化（表1参照）を求め、溶血試薬の溶血能力を調べた。表1において符号iで示すように、人全血に超音波振動を与えることによりこれを溶血できることが判る。

**【0026】【実施例4】：CRPの測定方法1**

1) 抗CRP抗体感作ラテックス液の調整

平均粒径0.2μmのポリスチレンラテックス（例えば日本合成ゴム社製：固形分10%）10mLに、約10mg/mLの抗ヒトCRPウサギ抗体液（pH7.5、100mmol/Lトリス塩酸緩衝液、0.1%アジ化Na）を添加し、30℃で一昼夜静置した後、3600rpmで遠心分離した沈澱物に0.2W/V%牛血清アルブミンpH8.5、100mmol/Lトリス塩酸緩衝液を添加し、抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液に調整した。

**【0027】2) CRP測定方法**

EDTA-2K抗凝固剤を用いて通常の採血法により採血した人全血0.04mLをセル1に収容し、これに、表1に示した溶血試薬水溶液a～gを0.5mL添加し、37℃で3分間インキュベーションした後、上記1)で調整した抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液を1.5mL添加し、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後4～5分目における1分間当たりの吸光度変化を求めた。

**【0028】**別途、血漿を検体とした市販のラテックス免疫比濁法CRP測定キットを用いて前記検体を検定して検量線を作成した。図7は、前記CRP測定に得られた結果に基づいて作成した検量線を示すもので、純水aおよびサポニン水溶液bなどを用いて全血を強制的に溶\*

$$A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット} \%)$$

… (1)

但し、A：実際に測定された吸光度変化量、A'：被検体試料中の血漿成分を100%に換算した吸光度変化量）なる演算を行って求めた分析値と血清を検体とした分析値との相関試験（n=40）を実施したところ、図9に示すように、実施例6の結果よりもより良好な結果が得られた。

**【0033】**上述の実施例では、凝集混合液に対する光照射による吸光度変化を測定するようにしているが、これに代えて、散乱光変化を測定するようにしてもよい。

**【0034】**

**【発明の効果】**この発明は、以上のような形態で実施され、以下のような効果を奏する。

**【0035】**この発明によれば、全血被検液を遠心分離操作などの前処理を行うことなく、直接、全血被検液を用いることができるので、測定時間の短縮、測定コスト

(4)

8

\*血したものにおいては、図中の符号a、bで示すように、良好な感度の検量線が得られた。しかしながら、各種界面活性剤c～gを用いた場合には、凝集反応が阻害され、図中の符号c～gで示すように、免疫反応には適さないという結果となった。

**【0029】【実施例5】：凍結法または超音波振動法による溶血試料を用いたCRP測定方法**

前記実施例2または実施例3で溶血した後の生理食塩水による希釈操作の代わりに、実施例4で作製した抗ヒト

CRP抗体感作ラテックス懸濁液を2.0mL添加し、分光光度計1を用いて波長800nmにおける反応開始後4～5分目における1分間当たりの吸光度変化を求めた。

**【0030】**別途、血清または血漿を検体とした市販のラテックス免疫比濁法CRP測定キットを用いて前記検体を検定して検量線を作成した。この場合、図7の符号h、iで示すように、良好な感度の検量線が得られた。

**【0031】【実施例6】：CRPの測定方法2**

前記実施例4で用いた抗ヒトCRP抗体感作ラテックス懸濁液の代わりに、市販のラテックス免疫比濁法CRP

測定キットを用い、溶血試薬として0.5W/V%サポニン水溶液を用いる以外は実施例4と同様の測定方法により、波長800nmにおける反応開始後4～5分目における1分間当たりの吸光度変化を求め、事前に作成した検量線より、全血を検体としたこの発明の分析値と血清を検体とした分析値との相関試験（n=40）を実施したところ、図8に示すように、良好な結果が得られた。

**【0032】【実施例7】：ヘマトクリット補正**

前記実施例6において、この発明による分析値に関して、測定した全血検体を同時に血球カウンタ（例えば堀場製作所製：LC-240A）によって、そのヘマトクリット値を測定し、

$$A' = A \times 100 / (100 - \text{ヘマトクリット} \%)$$

… (1)

の低減および測定操作の簡略化が図れる。そして、検査要員が血液に接触する機会が少なくて済み、感染への危険性が大幅に低減される。

**【0036】**そして、この発明においては、ヘマトクリット補正を行うようにしているので、精度のより優れたデータを得ることができる。

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】**この発明方法で用いるセルの一例を示す斜視図である。

**【図2】**この発明方法で用いる分光光度計の構成を概略的に示す図である。

**【図3】**この発明方法で用いる凍結セルホルダーの一例を示す斜視図である。

**【図4】**この発明方法で用いる超音波ノズルの一例を示す斜視図である。

(5)

9

【図5】各種の溶血試薬水溶液を用いて全血を溶血させた試料の波長300～1000nmにおける吸収スペクトルを示す図である。

【図6】各種の溶血試薬水溶液を用いて全血を溶血させた試料の波長800nmにおける溶血反応タイムコースを示す図である。

【図7】CRP測定を行ったときに得られた検量線の一

10

例を示す図である。

【図8】ヘマトクリット補正を行わないときにおける全血検体と血漿検体との相関関係を示す図である。

【図9】ヘマトクリット補正を行ったときにおける全血検体と血漿検体との相関関係を示す図である。

【符号の説明】

B…全血、S…溶血処理を施した全血、L…照射光。